

УДК 579.26:635.64

© 2016

*Ю.В. Коломієць,**кандидат
біологічних наук**І.П. Григорюк,**член-кореспондент
НАН України,
доктор біологічних наук**Національний
університет біоресурсів
і природокористування
України**Л.М. Буценко,**кандидат біологічних наук**Інститут
мікробіології і вірусології
імені Д.К. Заболотного
НАН України*

БАКТЕРІАЛЬНА МІКРОФЛОРА НАСІННЯ СОРТІВ ТОМАТІВ ЗА УМОВ ПРОТРУЄННЯ ФУНГІЦИДОМ

Мета. Проаналізувати якісні зміни у складі мікробіоти насіння сортів томатів за умов передпосівного його протруєння фунгіцидом.

Методи. У досліджах застосовували протруєне і непротруєне насіння 16 детермінантних сортів томатів української селекції.

Аналіз насіння томатів здійснювали за класичними мікробіологічними методами.

Антагоністичну активність ізолятів визначали за методом перпендикулярних штрихів.

Результати. З поверхні необробленого насіння виділено бактеріальні ізоляти з різним кількісним та якісним складом мікрофлори. Оброблене протруєником насіння різних сортів томатів відзначалося наявністю лише 4-х типів колоній. З необробленого насіння виявлено 5 ізолятів з антагоністичною активністю щодо тест-культур.

Висновки. Мікробіота необробленого фунгіцидом насіння сортів томатів є різноманітною, ніж протруєного. Установлено, що ізоляти ОБ1, ОБ2, ЧАЗ, КМ2 і ФЛ1 з епіфітної мікрофлори необробленого насіння томатів є перспективними для обмеження розвитку збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та чорної бактеріальної плямистості.

Ключові слова: томат, насіння, мікробіота, протруєники, корисна мікрофлора.

Поверхня рослин заселена аборигенними мікроорганізмами і випадковими, що швидко елімінуються. Значна кількість мікробів потрапляє на рослини і насіння із вітром, пилом, дощем та ін. Видовий склад і чисельність мікроорганізмів на поверхні рослин регулюють макроорганізми рослини-живителя та умови навколишнього середовища. Рослини виділяють органічні і мінеральні речовини, що використовують мікроорганізми [5, 13].

Мікрофлора насіння може стимулювати або гальмувати схожість насіння та продуктивність рослин. Значна кількість епіфітів здатна продукувати вітаміни та речовини, які стимулюють ріст, розвиток і формування потужної кореневої системи рослин [8]. Показано, що кількісний і якісний склад мікрофлори, наприклад насіння сої, залежить від сортових особливостей, погодних умов,

фаз росту та розвитку рослин [6].

Сапротрофні мікроорганізми не спричиняють інфекційного процесу, формують динамічну рівновагу в системі «сапротроф — патоген» і підвищують стійкість рослин проти фітопатогенних організмів. Бактеріальні ендо- і епіфіти захищають рослини від нематод і шкідливих комах, підвищують їхню стійкість проти абіо- та біотичних чинників середовища [10]. Захисна роль характерна і для слабоагресивних фітопатогенних бактерій, оскільки слабоагресивний штам зумовлює підвищення стійкості рослин проти високоагресивного. Практично кількість фітопатогенних бактерій на поверхні органів рослин залежить від видових особливостей, фаз вегетаційного періоду, кліматичних умов, інтенсивності та спрямованості фізіолого-біохімічних процесів [7].

Метаболізації патогенів у структурних компартментах насіння навіть у невеликих кількостях приділяють особливу увагу в сільськогосподарському виробництві, оскільки поширення збудників хвороб призводить до зниження якості і кількості врожаю польових культур [12]. Знезараження насіння томатів здійснюють термічною обробкою і обробкою речовинами рослинного та хімічного походження.

Застосування протруйників зменшує здатність бактерій до біосинтезу біологічно активних речовин, що може істотно впливати і на рослини [2, 10, 11]. Підтримання і збереження на оптимальному рівні біорізноманіття асоційованих з рослинами мікроорганізмів є основою природного їх захисту від збудників хвороб.

Отже, мікроорганізми листової поверхні і насіння, зокрема й фітопатогенні, формують своєрідні асоціації, вплив на які хімічних і біологічних пестицидів вивчено фрагментарно.

Мета досліджень — установити детермінаційні зміни у якісному складі мікробіоти насіння сортів томатів за його передпосівного протруєння фунгіцидом.

Методика досліджень. Об'єкт досліджень — не оброблене і оброблене протруйником насіння 16 детермінантних сортів томатів української селекції. Їх занесено до Державного реєстру сортів рослин, що придатні для поширення в Україні на 2015 р. та стійкі проти основних грибоквих захворювань. Зокрема, це сорти Чайка, Малиновий дзвін, Флора, Клондайк, Елеонора, Оберіг, Атласний, Зореслав, Господар, Кіммерієць, Дама, Легінь, Любимий, Талан, Фландрія та Кумач. Для дослідження ефективності дії фунгіциду на мікробіоту насіння рослин томатів обробляли протруйником з діючими речовинами (200 г/л карбоксину, 200 г/л тіраму).

Для ізоляції бактерій насіння томатів після 15 хв промивання проточною і стерильною водогінною водою розтирали в ступці з 0,5 мл фізіологічного розчину, після чого невелику кількість матеріалу наносили на поверхню картопляного агару густими штрихами від одного краю чашки Петрі до іншого. Бактерії культивували в термостаті упродовж 24 год за температури 28°C. Морфологічні властивості бактерій вивчали за класичними методами [4, 14].

Антагоністичну активність ізолятів визначали за методом відстроченого антагонізму [8, 9]. Для цього на картопляний

агар штрихом за діагоналлю чашки Петрі висівали потенційні мікроорганізми-антагоністи. Після 5-ти діб культивування перпендикулярно до лінії росту бактерій-антагоністів петлею підсівали суспензію клітин тест-культури титром 10^6 кл./мл за стандартом мутності [8]. Як тест-культури використовували *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984 штами P8, P12, P73, P110, P115 і 4999, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978 штами 4213, Pst2, Pst120 та BB9 (отримані з колекції Інституту пестицидів та захисту рослин, Сербія), *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 штам 9098 (з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України). Ступінь чутливості тест-культур до впливу антагоніста оцінювали за величиною діаметра зони гальмування росту тест-культури.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакета прикладних програм STATISTICA v.6.0.

Результати досліджень. Протруєння насіння є одним із важливих заходів у системі захисту посівів сільськогосподарських культур від хвороб і шкідників. Воно спричиняє значні зміни складу мікроорганізмів на поверхні насіння, що може гальмувати ріст і розвиток рослин.

Отримані ізоляти з поверхні насіння 16 сортів томатів мали колонії різної форми, жовтого, білого, бежевого, рожевого, коричневого й оранжевого кольорів, прозорі й напівпрозорі, з матовою та глянцевою поверхнею, рівними і нерівними краями. Для кожного сорту томатів був характерний різний кількісний та якісний склад мікрофлори насіння. Переважна кількість ізолятів із не обробленого протруйником насіння сортів томатів свідчила про велику різноманітність мікробіоти.

Найбільшу кількість типів ізолятів нами виділено із не обробленого фунгіцидом насіння сорту Чайка (табл. 1), з якого було ізольовано: 1 — ізолят із сірувато-білими колоніями, 3 — з рожевими і 11, що утворювали колонії, забарвлені жовтим кольором (від кремового до оранжевого). Мікробіота насіння сортів томатів Флора, Господар, Кіммерієць, Дама і Фландрія також мали різноманітний видовий склад. З цих сортів томатів виділено 36 ізолятів жовтого кольору та 12 — сірувато-білого. Найменший видовий склад визначено

у мікробіоти із насіння сортів Клондайк, Любимий та Кумач. Із насіння сорту Клондайк відібрано 1 ізолят із жовтими колоніями і 2 — бежевими. Колонії жовтого кольору на основі морфологічно-культуральних властивостей нами попередньо ідентифіковані як *Pantoea agglomerans*.

Невід'ємною складовою в захисних технологіях зберігання і підготовки до сівби є хімічне протруєння насіння, яке, однак, може спричиняти порушення динамічної рівноваги між окремими групами мікроорганізмів і стимулювати виникнення патологічних процесів у рослин під час онтогенезу [7]. За дії хімічних і біологічних пестицидів відбувається не лише пригнічення розвитку патогенів, а й зниження чисельності мікроорганізмів корисної мікрофлори, які лімітують поширення патогенів різної вірулентності та ступеня агресивності.

За обробки насіння сортів томатів фунгіцидом відбувалося значне зменшення чисельності і різноманітності мікроорганізмів (див. табл. 1). Для обробленого протруєником з діючими речовинами (200 г/л карбоксину, 200 г/л тіраму) насіння сортів томатів характерними були лише 4 типи колоній: бежевого кольору з рівними краями опуклої форми, з нерівними — плоскої, а також плоскі та опуклі сірувато-білого кольору з рівними краями. На поверхні протруєного насіння відсутні бактерії,

що утворюють колонії жовтого кольору, серед яких є представники виду *Pantoea agglomerans*. За даними Р. І. Гвоздяка [3], на поверхні насіння і рослин бактерій *Pantoea agglomerans* може бути до 80–90% загальної кількості бактеріальної мікрофлори, яку називають «бактеріями-супутниками» — антагоністами фітопатогенів.

Стійкість проти патогенів залежить від наявності у складі мікрофлори мікроорганізмів з антагоністичними властивостями та здатністю швидко колонізувати поверхню рослин. Особливо важливими антагоністами фітопатогенних бактерій і грибів у фітоагроценозах є представники родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Pantoea* та деякі інші мікроорганізми [1, 3].

Для подальших досліджень серед ізолятів, виділених із необробленого насіння томатів, нами відібрано 5 ізолятів, які виявляли антагоністичну активність щодо тест-культур. Ізолят ЧА3 виділено із насіння сорту Чайка, ізоляти ОБ1 і ОБ2 — з насіння сорту Оберіг, ізолят КМ2 — Кіммерієць, ФЛ1 — Фландрія. Для ізоляту ЧА3 було характерне формування матових і плоских колоній бежевого кольору з темним візерунком і рівними краями; ОБ1 — матових, темно-бежевого кольору і плоских колоній неправильної форми, ОБ2 — матових, плоских колоній

1. Бактеріологічний аналіз насіння сортів томатів

Сорт	Колонії бактерій, виділених із насіння				
	не обробленого			обробленого протруєником	
	жовті	сірувато-білі	рожеві	бежеві	сірувато-білі
Чайка	11	1	3	2	1
Малиновий дзвін	6	2	2	2	2
Флора	8	2	3	1	2
Клондайк	1	1	1	—	1
Елеонора	5	2	3	1	—
Оберіг	6	2	—	1	1
Атласний	5	3	1	2	1
Зореслав	6	2	—	2	2
Господар	7	2	2	2	1
Кіммерієць	8	2	2	1	2
Дама	6	3	2	1	—
Легінь	7	3	—	—	2
Любимий	3	1	1	2	1
Талан	5	1	1	—	1
Фландрія	7	3	2	1	2
Кумач	2	2	1	1	1
НІР ₀₅	2,88	2,29	2,88	1,27	1,27

2. Антагоністична активність ізолятів, виділених із насіння сортів томатів

Тест-культура	Діаметр зони відсутності росту, мм				
	ЧА3	ОБ1	ОБ2	КМ2	ФЛ1
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> :					
P8	80	40	70	50	60
P12	40	40	44	30	70
P73	50	44	44	20	30
P110	50	40	44	30	60
P115	44	80	50	30	40
4999	80	80	60	44	30
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> :					
4213	60	60	74	20	20
Pst2	50	34	80	44	26
Psr120	50	50	80	46	20
BB9	60	30	76	40	60
<i>X. vesicatoria</i> 9098	56	50	74	44	40
HIP ₀₅	2,29	2,09	1,92	2,29	1,92

світло-бежевого кольору з нерівними краями; КМ2 — блискучих, з темним трохи піднятим центром колоній бежевого кольору і нерівними краями; ФЛ1 — блискучих, сірвато-білого кольору з рівними краями.

Ізолят ОБ2 виявляв високу антагоністичну активність до збудника бактеріальної крапчастості, діаметр пригнічення росту штамів *P. syringae* pv. *tomato* 4213, Pst2, Psr120 і BB9 становив 74–80 мм (табл. 2).

Меншою чутливістю до антагоніста вирізнялися штами *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P8, P12, P73, P110, P115 і 4999 (збудника бактеріального раку), зони гальмування росту в яких становили 44–70 мм.

Діаметр пригнічення росту штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P8, P12, P73, P110, P115 і 4999 ізолятом ОБ1 становив 40–80 мм. Щодо штамів *P. syringae* pv. *tomato* 4213, Pst2, Psr120 і BB9, то ізолят ОБ1 зумовлював утворення зон гальмування росту в межах 30–60 мм. Ізолят ЧА3 також мав високу антагоністичну активність до збудників бактеріального раку та бактеріальної крапчастості. Рівень антагоністичної активності до штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P8, P12, P73, P110, P115 і 4999 — 40–80 мм. До штамів *P. syringae* pv. *tomato* 4213, Pst2, Psr120 і BB9 ізолят ЧА3 виявляв меншу антагоністичну активність, водночас зони гальмування росту коливались у межах 50–60 мм. Ізоляти КМ2 і ФЛ1 мали дещо меншу антагоністичну активність щодо тест-культур. Діаметр пригнічення росту штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P8, P12, P73, P110, P115 і 4999 ізолятом КМ2 становив 20–50 мм, штамів *P. syringae* pv. *tomato* 4213, Pst2, Psr120 та BB9 — 20–46 мм. Рівень антагоністичної активності ізоляту ФЛ1 до штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P8, P12, P73, P110, P115 і 4999 — 30–70 мм, а *P. syringae* pv. *tomato* 4213, Pst2, Psr120 та BB9 — 20–60 мм. Ізоляти виявляли антагоністичну активність також до збудника чорної бактеріальної плямистості, діаметр пригнічення росту штаму *X. vesicatoria* 9098 становив 40–74 мм.

Отже, проведені нами дослідження свідчать, що ізоляти ЧА3, ОБ1, ОБ2, КМ2 і ФЛ1 з різною активністю здатні пригнічувати ріст тест-культур і є потенційними штамми для боротьби зі збудниками бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та чорної бактеріальної плямистості.

Висновки

Мікробіота необробленого фунгіцидом насіння сортів томатів є різноманітнішою, ніж протруєного. Найчастіше з не обробленого пестицидами насіння сортів томатів виділяли ізоляти, які утворювали колонії жовтогарячого кольору і були нами попередньо ідентифіковані як *Pantoea agglomerans*. Визначені ізоляти бактерій жовтого кольору є основними мікроорганізмами для захисту сортів томатів української селекції від патогенів. Протруєння насіння сортів томатів спричиняло зникнення

мікроорганізмів з антагоністичною активністю до фітопатогенних бактерій. Ізоляти ОБ1, ОБ2, ЧА3, КМ2 і ФЛ1 з еліфітної мікрофлори не протруєного фунгіцидом насіння рослин томатів є перспективними для обмеження розвитку збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та чорної бактеріальної плямистості. Зони гальмування росту, зумовлені ізолятами щодо *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, становлять 40–80 мм, *P. syringae* pv. *tomato* — 30–80 і *X. vesicatoria* — 40–74 мм.

Бібліографія

1. Антагонистические свойства новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы/С.А. Бурцева, Т.Ф. Сырбу, В.А. Сланина и др.//Микробиология і біотехнологія. — 2007. — № 1. — С. 40–45.
2. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестициди/В.Ф. Петриченко, О.В. Корнійчук, Л.А. Пасічник та ін.//Вісн. аграр. науки. — 2013. — № 4. — С. 21–26.
3. Гвоздяк Р.И. *Pantoea agglomerans* — возбудитель болезней пырея ползучего (*Elytrigia repens*) и райграса высокого (*Arrhenatherum elatius*)/Р.И. Гвоздяк, Л.М. Яковлева//Мікробіологічний журнал. — 2007. — 69, № 1. — С. 61–67.
4. Діагностика фітопатогенних бактерій: метод. реком./В.П. Патица, Л.А. Пасічник, Л.А. Данкевич та ін. — К., 2014. — 76 с.
5. Елланська Н.Е. Эколого-трофичные взаимосвязи высших растений и микроорганизмов/Н.Е. Елланська, Е.А. Головкин//Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — 36, № 5. — С. 383–389.
6. Кошевський І.І. Епіфітна мікрофлора сої в умовах Лісостепу України/І.І. Кошевський, Н.В. Житкевич, В.С. Митько//Наук. вісн. Ужгородського нац. ун-ту. — Серія: Біологія. — 2001. — Вип. 9. — С. 114–115.
7. Канивец В.И. Бактериальная микрофлора протравленных семян сахарной свеклы/В.И. Канивец, И.Н. Пищур//Микробиология. — 2001. — 70, № 3. — С. 370–373.
8. Мікробіота листків і зерна ячменю ярого за дії гербіциду і біопрепарату/В.П. Карпенко, В.Я. Білоножка, Р.М. Притуляк та ін.//Проблеми екологічної біотехнології. — 2012. — № 2. — С. 42–53.
9. Основы учения об антибиотиках: учебник. — 6-е изд., перераб. и доп./Н.С. Егоров. — М.: Наука, 2004. — 528 с.
10. Пасічник Л.А. Епіфітна і ендоефітна мікрофлора здорового зерна та вегетуючих рослин пшениці/Л.А. Пасічник, Р.І. Гвоздяк, С.Ф. Ходос//Вісн. ДАУ. — Серія: Біологія. — 2005. — № 2 (15). — С. 141–148.
11. Пасічник Л.А. Епіфітна і ендоефітна мікрофлора здорового зерна та вегетуючих рослин пшениці//Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія: зб. статей/Л.А. Пасічник, Р.І. Гвоздяк, С.Ф. Ходос. — Житомир: ДАУ, 2005. — С. 8–13.
12. Пасічник Л.А. Епіфітна фаза існування *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* — збудника ореольного бактеріозу вівса/Л.А. Пасічник//Мікробіологічний журнал. — 1999. — 61, № 6. — С. 9–14.
13. Сергієнко В. Вплив обробки насіння на розвиток рослин та продуктивність сої/В. Сергієнко//Агробізнес сьогодні. — 2014. — № 15–16. — С. 286–287.
14. Klement Z. Methods in phytobacteriology/Z. Klement, K. Rudolph, D.C. Sands. — Budapest, 1990. — 567 p.

Надійшла 10.04.2016.